

การผลิตกรด 6-อะมิโนเพนซิลานิกโดยใช้เซลล์ Escherichia coli ที่ถูกตรึง



นางสาวจันทร์เพ็ญ เคชะอำไพ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


พ.ศ. 2529

ISBN 974-566-897-4

013467

PRODUCTION OF 6-AMINOPENICILLANIC ACID BY IMMOBILIZED

WHOLE CELLS OF ESCHERICHIA COLI



Miss Chunphen Decha-umphai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1986

ISBN 974-566-897-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การผลิตรวด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกโดยใช้เซลล์ Escherichia coli
ที่ถูกต้อง

โดย

นางสาวจันทร์เพ็ญ เคชะอำไพ

ภาควิชา

ชีวเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษา

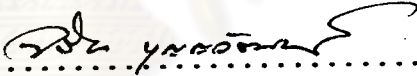
รองศาสตราจารย์ ดร. สัณฑ์ พลิชยกุล





บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

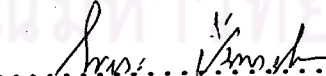
..... คณบดี บัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. มนูญ วีรบุรุษ)

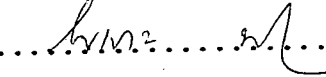
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญวัฒน์)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สัณฑ์ พลิชยกุล)


..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ คำรงค์เลิศ)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ทิพย์ทัศน์)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกโดยใช้เชื้อ <u>Escherichia coli</u> ที่ถูกตรึง
ชื่อนิสิต	นางสาว จันทร์เพ็ญ เดชะอำไพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สันต์ พณิชยกุล
ภาควิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2528



บทคัดย่อ

ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิโลสสูง จากแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ E.coli ATCC 9637, ATCC 11105 และ S.rubidaea ATCC 181 โดยอาศัยคุณสมบัติการต้านยาเพนนิซิลิน จี และรูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิโลส เป็นดัชนี พบว่า E.coli ATCC 9637 จะให้แอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิโลสสูงสุด เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับค่าที่ 30 องศาเซลเซียส เมื่อมี 0.2 เปอร์เซ็นต์ กรดฟีนอลอะซีติก เป็นตัวชักนำ สภาวะเหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิโลสของ E.coli ATCC 9637 คือ อาหารสูตรปรับค่าที่เสริมด้วย 0.2 เปอร์เซ็นต์ กรดฟีนอลอะซีติกและ 0.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมกลูตาเมตเป็นตัวชักนำและสารต้นตอ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28-30 ชั่วโมง แอกติวิตีของเอนไซม์ที่ได้ในสภาวะนี้มีค่าประมาณ 40 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนสุทธิของเซลล์ ที่ค่าการเจริญ 440 หน่วยเซลล์ ถ้าอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเพิ่มสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส หรือใช้กลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นผลให้แอกติวิตีของเอนไซม์ต่ำลง นอกจากนี้ถ้าเสริมกรดฟีนอลอะซีติกสูงกว่า 0.2 เปอร์เซ็นต์ ก็จะมีผลลดแอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิโลสด้วย

ในการตรึงเชื้อ E.coli ATCC 9637 ด้วยแคลปา-คาร์ราจีแนนและวุ้น พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ 10-15 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ตรึงด้วย แคลปา-คาร์ราจีแนน 2.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และวุ้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ขนาดรูปร่างลักษณะตลอดจน strength ของเม็ดเจลเซลล์ตรึงแปรตามปัจจัยดังต่อไปนี้

คือ ความเร็วในการกวนสารละลาย, ชนิดของวัสดุครึ่ง, ความเข้มข้นของวัสดุครึ่ง และความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้ รวมทั้งขนาดของเม็ดเจลเซลล์ครึ่งจะมีผลกระทบต่อแอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลสในเซลล์ครึ่งแคปทา-คาร์ราจีแนน ค่า % activity recovery ในเซลล์ครึ่งคาร์ราจีแนน (85-90 เปอร์เซ็นต์) จะสูงกว่าค่าที่วัดได้ในเซลล์ครึ่งวัน (75-80 เปอร์เซ็นต์) การเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ 0.1 โมลาร์ ไม่มีผลเพิ่ม strength ของเซลล์ครึ่งทั้งสองชนิด แต่จะลด % activity recovery ของเซลล์ครึ่งทั้ง 2 ชนิดลงบ้าง และมีผลเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ในเซลล์ครึ่งเจลได้บ้างเล็กน้อย การเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ 0.1 โมลาร์และเฮกซาเมทิลลีนไดอามีน 0.1 โมลาร์หลังครึ่งเซลล์จะมีผลในการเพิ่ม strength ของเม็ดเจลเซลล์ครึ่งแคปทา-คาร์ราจีแนน มากกว่า 2 เท่าตัว ในขณะที่ strength ของเม็ดเจลเซลล์ครึ่งวันเพิ่มขึ้นบ้างเล็กน้อย

ผลการเปรียบเทียบสมบัติของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ในเซลล์ E. coli ATCC 9637 อีสระ; เซลล์ E. coli ATCC 9637 ครึ่งวันและแคปทา-คาร์ราจีแนนเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทิลลีนไดอามีน ให้ผลดังนี้ pH เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลินจี มีค่า 7.5-8.5, 6.5 และ 7.0-7.5 อุณหภูมิเหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา คือ 50, 55 และ 50-55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์ในเซลล์ครึ่งจะมีความสามารถในการทนทานต่อสภาวะที่เป็นกรด มากกว่าในเซลล์ E. coli อีสระ เอนไซม์ในเซลล์ครึ่งและเซลล์อีสระสามารถเก็บไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง โดยไม่สูญเสียแอกติวิตีเลย สำหรับค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลสในเซลล์ E. coli ATCC 9637 อีสระ, เซลล์ E. coli ATCC 9637 ครึ่งวันและครึ่งแคปทา-คาร์ราจีแนนเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทิลลีนไดอามีน มีค่าดังนี้ K_i ของเพนนิซิลิน จี ; 6.7, 5.5 และ 3.1 มิลลิโมลาร์ v_{max} ; 16.7, 6.7 และ 5.3 หน่วยต่อกรัมเซลล์อีสระ ตามลำดับ K_i ของกรดฟีนอลอะซีติก; 4.0, 8.0 และ 7.0 มิลลิโมลาร์ และ K_i ของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก; 12.3, 20.3 และ 35.3 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

เมื่อเก็บรักษาเซลล์ E. coli ATCC 9637 ในนอร์มอลซาลีนที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 80 วัน จะมีแอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลสเหลืออยู่ 80 เปอร์เซ็นต์ และเก็บเซลล์ E. coli ATCC 9637 ครึ่งวันและครึ่งแคปทา-คาร์ราจีแนนเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทิลลีนไดอามีน ไว้ในนอร์มอลซาลีนและ 0.3 โมลาร์โพแทสเซียมคลอไรด์ที่ 4 องศาเซลเซียส

จะเก็บได้นาน 30 วัน โดยไม่มีการสูญเสียแอกติวิตีของเอนไซม์ นอกจากนี้พบว่า E.coli ATCC 9637 ตีรังวัน และตีรังแคปทา-คาร์ราจีแนนเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทิลลีนไดอามีน จะยังคงแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลสอย่างสมบูรณ์ เมื่อทำการวัดทุก ๆ 5 วัน เป็นเวลาอย่างน้อย 30 วัน โดยไม่มีการสูญเสียแอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title Production of 6-Aminopenicillanic Acid by Immobilized
Whole Cells of Escherichia coli

Name Miss Chunphen Decha-umphai

Thesis Advisor Associate Professor Sanha Panichajakul, Ph.D.

Department Biochemistry

Academic Year 1985



Abstract

Screening of the three bacterial strains, namely E.coli ATCC 9637, ATCC 11105 and S.rubidaea ATCC 181 for having a high ability to produce penicillin acylase was done by means of penicillin G resistance test and detection of the enzyme activity in concurrent with the cell growth pattern. E.coli ATCC 9637 was selected due to the high production of penicillin acylase and growth in minimum medium at 30°C.

The optimal conditions for growth and enzyme production of E.coli ATCC 9637 which gave 440 Klette unit and penicillin acylase activity of 54.2 units/mg total protein was found in minimum medium (0.2% phenylacetic acid and 0.5% sodium glutamate) at 30°C. The culture temperature higher than 30°C repressed both growth and enzyme synthesis. Furthermore concentration of phenylacetic acid higher than 0.2% also reduced the penicillin acylase synthesis by means of catabolite repression.

The optimal condition for immobilization of E.coli ATCC 9637 by entrapment in K-carrageenan and agar gel lattice were accomplished by two phase system consisting of 10-15% w/w of E.coli cells in 2.5%

w/v and 5.0% w/v of K-carrageenan and agar gel, respectively. The size and shape including strength of beads were found to be dependent on the stirring speed of gel solution stirring, types of gel, cell and gel concentration. Penicillin acylase activity was reduced according to the increment of K-carrageenan gel size. Percentage of the activity recovery in K-carrageenan immobilized cells (80-85%) was slightly higher than that in the agar (70-80%). The impliment of 0.1 molar glutaraldehyde did not affect the strength of both types of immobilized cells but it reduced the percentage of enzyme recovery and slightly supported the stability of the immobilized cells. However, the addition of 0.1 molar hexamethylenediamine to the previous condition could strengthen the hardness of K-carrageenan immobilized cells more than that of the agar.

The properties of penicillin acylase of E.coli ATCC 9637 cells were investigated and compared with those of immobilized cells. With regard to optimal pH, it was observed that penicillin acylase of the immobilized cell favored to hydrolyse penicillin G to 6-aminopenicillanic acid in acidic pH range in comparison to the free cells (7.5-8.5 for free cells, 6.5 and 7.0-7.5 for K-carrageenan and agar immobilized cells respectively). The optimal temperature of immobilized cells was slightly higher and broader than that of the free cells (50, 55 and 50-55°C respectively). No difference in thermal stability of penicillin acylase enzyme was found among the three types of cell when kept at 37°C for 5 hours.

The kinetic constants of penicillin acylase in E.coli ATCC 9637, K-carrageenan and agar immobilized cells were also demonstrated. The K_m values of the enzyme preparations for penicillin G were 6.7, 5.5 and 3.1 mM at the V_{max} of 16.7, 6.7 and 5.3 unit/g free cells respectively.

The K_1 value were found to be 4.0, 8.0 and 7.0 mM for phenylacetic acid and 12.3, 20.3 and 35.3 mM for 6-aminopenicillanic acid, respectively. The E.coli ATCC 9637 cells can be stored at 4°C in normal saline for over 80 days with only 20% loss in penicillin acylase activity. In contrast, the activity of the enzyme in immobilized cells implement with glutaraldehyde and hexamethylenediamine stored in normal saline and 0.3 M KCl at 4°C for a period of 30 days was not loss as the penicillin acylase can be detected at every 5 day intervals for 30 days at 25°C without any decrease in its activity.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กิตติกรรมประกาศ

ด้วยคำ "ขอบคุณ" เพียงคำเดียว ก็ไม่อาจทดแทนสิ่งที่บุคคลเหล่านั้นได้มอบให้ เพราะ "น้ำใจ" ไม่อาจจะหาสิ่งใดมาเปรียบประมาณกันได้เลย

รองศาสตราจารย์ ดร.สันต์ พณิชยกุล

รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ทิพย์ทัศน์

พี่ เพื่อน น้อง และเจ้าหน้าที่ทุกคน ในภาควิชาชีวเคมี

และบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สารบัญ

๘

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ช
กิตติกรรมประกาศ	ญ
สารบัญตารางประกอบ	ณ
สารบัญรูปประกอบ	ต
บทที่	
1. บทนำ	1
2. วัสดุภัณฑ์ เคมีภัณฑ์ และเครื่องมือ	
2.1 ครุภัณฑ์	28
2.2 วัสดุและเคมีภัณฑ์	29
2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	30
2.4 การเตรียมสารละลาย	31
2.5 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์	32
2.6 การศึกษาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์	33
2.7 การเตรียมสับสเตรตกรดพีนิลอะซีทิล-4-อะมิโนเบนโซอิก	33
2.8 การเตรียมเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส	34
2.9 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส	34
2.10 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เบตา-แลกแตมเมส	36
2.11 การวัดปริมาณโปรตีน	37
2.12 การคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส สูงสุด	37
2.13 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซีเลสของเซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637	38
2.14 การตรึงเซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637 โดยใช้แคปตา-คาร์ราจีแนน..	39

2.15	การตรึงเซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637 โดยใช้วัน	40
2.16	วิธีวัด strength ของเม็ดเจลเซลล์ตรึง	41
2.17	การศึกษาสภาวะเหมาะสมในการตรึงเซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637 ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนน	43
2.18	การศึกษาผลกระทบของโพแตสเซียมคลอไรด์ต่อ strength และแอก- ติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส ในเม็ดเจลเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน	45
2.19	การศึกษาสภาวะเหมาะสมในการตรึงเซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637 ด้วยวัน	45
2.20	การศึกษาผลกระทบของกลูตารัลดีไฮด์ ต่อ strength และแอกติวิตี ของเพนนิซิลิน เอซีเลส ในเม็ดเจลเซลล์ตรึง	46
2.21	การศึกษาผลกระทบของกลูตารัลดีไฮด์ และเฮกซาเมทิลซีนไดอามีน ต่อ strength และแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลสในเม็ดเจลเซลล์ ตรึง	47
2.22	การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของเพนนิซิลิน เอซีเลสของเซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637 อีสระ, เซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637 ตรึงวัน และเซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน	47
2.23	การศึกษาสภาวะเหมาะสมของการเก็บรักษาเซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637	49
2.24	การศึกษาสภาวะเหมาะสมของการเก็บรักษาเซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637 ตรึงวันและเซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์รา- จีแนน	50
2.25	การศึกษาเปรียบเทียบความเป็นไปได้ของการนำเซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637 ตรึงวันและเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนมาใช้ซ้ำ	50

3. ผลการทดลอง

- 3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลสสูง จาก 3 สายพันธุ์ 52
- 3.2 ผลการศึกษาสภาวะเหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ของ E.coli ATCC 9637 60
- 3.3 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการเจริญของ E.coli ATCC 9637 69
- 3.4 การผลิตเอนไซม์เบตา-แลคแตมเมส ของ E.coli ATCC 9637... 72
- 3.5 การศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนน กับอุณหภูมิแข็งตัวของเจลแคปปา-คาร์ราจีแนน 72
- 3.6 ผลกระทบของความเร็วของแท่งแม่เหล็กที่ใช้ในการกวนด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กต่อขนาดและรูปร่างลักษณะของเม็ดเจลเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน 75
- 3.7 ผลกระทบของขนาดเม็ดเจลต่อแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส ในเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน 78
- 3.8 ผลกระทบของความเข้มข้นแคปปา-คาร์ราจีแนน ต่อ strength และแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส ของเม็ดเจลเซลล์ตรึง 78
- 3.9 ผลกระทบของความเข้มข้นเซลล์ E.coli ATCC 9637 ในเม็ดเจลเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ต่อ strength และแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส ของเซลล์ตรึง 81
- 3.10 ผลกระทบของโพแตสเซียมคลอไรด์ต่อ strength และแอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ของเม็ดเจลเซลล์ตรึง แคปปา-คาร์ราจีแนน 81
- 3.11 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของวุ้นกับ อุณหภูมิแข็งตัวของเจลวุ้น 84

3.12	ผลกระทบของความเร็วของแท่งแม่เหล็กในการกวนสารละลายด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก ต่อขนาดและรูปร่างลักษณะของเม็ดเจลวัน	84
3.13	ผลกระทบของขนาดเม็ดเจลต่อแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส ของเม็ดเจลเซลล์ตรึงวัน	84
3.14	ผลกระทบของความเข้มข้นวัน ต่อ strength และแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส ของเม็ดเจลเซลล์ตรึงวัน	87
3.15	ผลกระทบของความเข้มข้นเซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637 ในเม็ดเจลเซลล์ตรึงวันต่อ strength และแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลสของเซลล์ตรึงวัน	87
3.16	ผลกระทบของกลูตารัลดีไฮด์ต่อ strength และแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส ของเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนและเซลล์ตรึงวัน	91
3.17	ผลกระทบของกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซามेटิลลีนไดอามีนต่อ strength และแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส ของเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนและเซลล์ตรึงวัน	91
3.18	ผลการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของเพนนิซิลิน เอซีเลส ของเซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637 อีสุระ, เซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637 ตรึงวันและเซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน	
	ผลการศึกษาเปรียบเทียบ pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเพนนิซิลิน เอซีเลส (optimum pH)	97
	ผลการศึกษาเปรียบเทียบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเพนนิซิลิน เอซีเลส (optimum temperature)	97
	เปรียบเทียบผลกระทบของ pH ต่อความเสถียรของเพนนิซิลิน เอซีเลส..	100
	เปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเพนนิซิลิน เอซีเลส.	100
	เปรียบเทียบผลกระทบของความเข้มข้นสับสเตรตต่อแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส	103

บท

ผลการศึกษาค่า K_i ของกรดฟีนอลอะซิดต่อเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส	103
ผลการศึกษาค่า K_i ของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกต่อเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซีเลส	103
3.19 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเก็บรักษาเซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637	111
3.20 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเก็บรักษาเซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637 ตรึงวันและเซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637 ตรึงแคปปา- คาร์ราจีแนน	114
3.21 ผลการศึกษความเป็นไปได้ของการนำเซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637 ตรึงวันและเซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์รา จีแนนมาใช้ซ้ำ	114
4. บทสรุปและวิจารณ์	118
เอกสารอ้างอิง	133
ภาคผนวก	
1. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอร์รี่	148
2. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก ซึ่งได้จากการ วัดแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส	149
3. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก โดยวิธีของ Balasingham	150
4. การวิเคราะห์แอกติวิตีของเบตา-แลคแตมเมส โดยวิธี Iodometric ...	151
5. เปรียบเทียบรูปแบบการเจริญในหน่วยเซลล์และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ <u>E.coli</u> ATCC 9637	152
ประวัติผู้เขียน	153

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. จุดชี้ที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน จี เอซีเลส	9
2. คุณสมบัติของเอนไซม์เพนนิซิลิน จี เอซีเลส	11
3. จุดชี้ที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน วี เอซีเลส	13
4. คุณสมบัติของเอนไซม์เพนนิซิลิน วี เอซีเลส	15
5. ตัวอย่างการใช้เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ในรูปของเซลล์อิสระหรือ เอนไซม์อิสระเพื่อผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก	20
6. ตัวอย่างการใช้เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ในรูปแบบของเอนไซม์ตรึง (immobilized enzyme) เพื่อผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก	24
7. ตัวอย่างการใช้เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ในรูปแบบของเซลล์ตรึง (immobilized cells) เพื่อผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก	26
8. เปรียบเทียบความสามารถในการต้านยาเพนนิซิลิน จี ของ <u>E.coli</u> ATCC 9637, ATCC 11105 และ <u>S.rubidaea</u> ATCC 181	53
9. เปรียบเทียบค่าการเจริญสูงสุดและความสามารถในการผลิตเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซีเลส สูงสุดของ <u>E.coli</u> ATCC 9637, ATCC 11105 และ <u>S.rubidaea</u> ATCC 181	58
10. เปรียบเทียบการเจริญและการฟอกจางสีน้ำเงินของสารละลายน้ำแฉ่ง-ไอโอดีน ของ <u>E.coli</u> ATCC 9637 กับ <u>K.pneumoniae</u> M5a1	73
11. การผลิตเบตา-แลคแทมเมสของ <u>E.coli</u> ATCC 9637 และ <u>K.pneumoniae</u> M5a1	74
12. ผลกระทบของความเข้มข้นสารละลายแคลโป-คาร์ราจีแนตต่ออุณหภูมิ แข็งตัวของเจล (gelling-temperature)	76
13. ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วในการกวนด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก กับเปอร์เซ็นต์ผลผลิตและรูปร่างลักษณะของเม็ดเจล	77
14. ผลกระทบของขนาดเม็ดเจลเซลล์ตรึงต่อแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส	79

ตารางที่	หน้า
15. ผลกระทบของความเข้มข้นสารละลายยูน ต่ออุณหภูมิแข็งตัวของเจล (gelling temperature)	85
16. ผลกระทบของความเร็วแห้งแม่เหล็กในการกวนสารละลายยูน ด้วย เครื่องกวนแห้งแม่เหล็กต่อขนาดรูปร่างลักษณะของเม็ดเจล	86
17. ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของเม็ดเจลเซลตรึงกับแอกติวิตีของ เพนนิซิลิน เอซีเลส	88
18. สรุปผลการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของเพนนิซิลิน เอซีเลส ในเซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637 อีสระ, เซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637 ตรึงยูนเสริมกลูตาไรลดีไฮด์และเฮกซาเมทิลลีนไคอามีน และเซลล์ <u>E.coli</u> ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน เสริมกลูตาไรลดีไฮด์ และเฮกซาเมทิลลีนไคอามีน	112

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. แผนผังขบวนการผลิตยาเพนนิซิลินชนิดใหม่	2
2. โครงสร้างของเพนนิซิลิน	3
3. วิวัฒนาการของสารประกอบเพนนิซิลินและอนุพันธ์ของกรด 6-อะมิโนเพนนิ- ซิลานิก	5
4. ขบวนการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกทางเคมี	6
5. ขบวนการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกทางชีวภาพ	6
6. ปฏิกริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลินเป็นกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ด้วยเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส	8
7. ปฏิกริยารีเอซีเลชันของเพนนิซิลิน เอซีเลส	18
8. เครื่องมือวัด strength ของเม็ดเจลเคลดริง	42
9. รูปแบบการเจริญและการผลิตเพนนิซิลิน เอซีเลส ของ <u>E.coli</u> ATCC 9637 ในอาหารสูตรอุดมและอาหารสูตรปรับต่ำ	55
10. รูปแบบการเจริญและการผลิตเพนนิซิลิน เอซีเลส ของ <u>E.coli</u> ATCC 11105 ในอาหารสูตรอุดมและอาหารสูตรปรับต่ำ	56
11. รูปแบบการเจริญและการผลิตเพนนิซิลิน เอซีเลส ของ <u>S.rubidaea</u> ATCC 181 ในอาหารสูตรอุดมและอาหารสูตรปรับต่ำ..	57
12. รูปแบบการเจริญและการผลิตเพนนิซิลิน เอซีเลส ของ <u>E.coli</u> ATCC 9637 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีแหล่งต้นตอคาร์บอนเป็นโซเดียม- กลูตาเมตและ/หรือกรดฟีนิลอะซีติก	61
13. รูปแบบการเจริญและการผลิตเพนนิซิลิน เอซีเลส ของ <u>E.coli</u> ATCC 9637 ในอาหารสูตรปรับต่ำ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส	63
14. รูปแบบการเจริญและการผลิตเพนนิซิลิน เอซีเลส ของ <u>E.coli</u> ATCC 9637 ในอาหารสูตรปรับต่ำเสริมโซเดียมกลูตาเมตความเข้มข้น ต่าง ๆ	64

15.	รูปแบบการเจริญและการผลิตเพนนิซิลิน เอซีเลส ของ <u>E.coli</u> ATCC 9637 ในอาหารสูตรปรับค่าเสริมกรดฟีนอลอะซีติกความเข้มข้นต่าง ๆ ..	66
16.	รูปแบบการเจริญและการผลิตเพนนิซิลิน เอซีเลส ของ <u>E.coli</u> ATCC 9637 ในอาหารสูตรปรับค่าและอาหารสูตรปรับค่าที่เติมกรดฟีนอลอะซีติกที่ระยะการเจริญต่าง ๆ ..	67
17.	รูปแบบการเจริญและการผลิตเพนนิซิลิน เอซีเลส ของ <u>E.coli</u> ATCC 9637 ในอาหารสูตรปรับค่าชนิดธรรมดา กับชนิดที่เสริมกลูโคส	68
18.	รูปแบบการเจริญและการผลิตเพนนิซิลิน เอซีเลส ของ <u>E.coli</u> ATCC 9637 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรอุดมเป็นเวลา 15 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนไปเลี้ยงในอาหารชนิดต่าง ๆ ..	70
19.	รูปแบบการเจริญและ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับค่าชนิดธรรมดา กับชนิดที่เสริมกรดฟีนอลอะซีติก เมื่อเลี้ยง <u>E.coli</u> ATCC 9637	71
20.	ผลกระทบของความเข้มข้นแคปตา-คาร์ราจีแนนต่อแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส, strength และเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของเม็คเจลเซลตรึงแคปตา-คาร์ราจีแนน	80
21.	ผลกระทบของความเข้มข้นเซล <u>E.coli</u> ATCC 9637 ที่ตรึงด้วยแคปตา-คาร์ราจีแนน ต่อแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส, strength และเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของเม็คเจลเซลตรึงแคปตา-คาร์ราจีแนน	82
22.	ผลกระทบของความเข้มข้นโพแตสเซียมคลอไรด์ต่อแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส และ strength ของเม็คเจลเซลตรึงแคปตา-คาร์ราจีแนน ...	83
23.	ผลกระทบของความเข้มข้นวัน ต่อแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส, strength และเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของเม็คเจลเซลตรึงวัน	89
24.	ผลกระทบของความเข้มข้นเซล <u>E.coli</u> ATCC 9637 ที่ตรึงด้วยวัน ต่อแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส, strength และเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของเม็คเจลเซลตรึงวัน	90

25.	ผลกระทบของความเข้มข้นกลูตาไรต์ไฮด์ต่อแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส และ strength ของเม็คเจลเซลตริ่ง	92
26.	ผลกระทบรวมของกลูตาไรต์ไฮด์กับเฮกซาเมทิลลีนไทอามีน ต่อแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส และ strength ของเม็คเจลเซลตริ่ง	93
27.	เม็คเจลเซลตริ่งแคปปา-คาร์ราจีแนน	95
28.	เม็คเจลเซลตริ่งวุ้น	96
29.	ผลกระทบของ pH ต่อแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส	98
30.	เปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส ...	99
31.	ผลของ pH ต่อความเสถียรของเพนนิซิลิน เอซีเลส	101
32.	เปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเพนนิซิลิน เอซีเลส.	102
33.	Lineweaver-Burk Plot ของเพนนิซิลิน เอซีเลส กับสับสเตรต เพนนิซิลิน จี ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	104
34.	Dixon Plot ของเพนนิซิลิน เอซีเลส ในเซลล์ <i>E. coli</i> ATCC 9637 อิศระ เมื่อแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของสารยับยั้งปฏิริยา คือ กรดฟีนิลอะซีติก	105
35.	Dixon Plot ของเพนนิซิลิน เอซีเลส ในเซลล์ <i>E. coli</i> ATCC 9637 ตริ่งวุ้น เมื่อแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของสารยับยั้งปฏิริยา คือ กรดฟีนิลอะซีติก	106
36.	Dixon Plot ของเพนนิซิลิน เอซีเลส ในเซลล์ <i>E. coli</i> ATCC 9637 ตริ่งแคปปา-คาร์ราจีแนน เมื่อแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของสารยับยั้งปฏิริยา คือ กรดฟีนิลอะซีติก	107
37.	Dixon Plot ของเพนนิซิลิน เอซีเลส ในเซลล์ <i>E. coli</i> ATCC 9637 อิศระ เมื่อแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของสารยับยั้งปฏิริยา คือ กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก	108

38. Dixon Plot ของเพนนิซิลิน เอซีเลส ในเซลล์ E.coli ATCC 9637
 ตรีงวันเสริมกลูตาไรต์ไฮด์และเฮกซาเมทิลลีนไคอามีน เมื่อแปรเปลี่ยน
 ความเข้มข้นของสารยับยั้งปฏิกิริยา คือ กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก 109
39. Dixon Plot ของเพนนิซิลิน เอซีเลส ในเซลล์ E.coli ATCC 9637
 ตรีงแคปทา-คาร์ราจีแนน เสริมกลูตาไรต์ไฮด์และเฮกซาเมทิลลีนไคอามีน
 เมื่อแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของสารยับยั้งปฏิกิริยา คือ กรด 6-อะมิโน
 เพนนิซิลานิก 110
40. เปรียบเทียบแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส ของเซลล์ E.coli
 ATCC 9637 อีสระ เมื่อเก็บเซลล์ในชนิดของสารละลาย และที่อุณหภูมิ
 ต่าง ๆ กัน 113
41. เปรียบเทียบแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส ของเซลล์ E.coli ATCC
 9637 ตรีงวันและแคปทา-คาร์ราจีแนน เสริมกลูตาไรต์ไฮด์และเฮกซาเมท-
 ธิลลีนไคอามีน เมื่อเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน 115
42. เปรียบเทียบแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส ของเซลล์ E.coli ATCC
 9637 ตรีงวันและแคปทา-คาร์ราจีแนน 116